

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **63-048213**

(43) Date of publication of application : **29.02.1988**

(51) Int.CI.

A61K 31/35
C07D493/10

(21) Application number : **61-190575**

(71) Applicant : **IDEMITSU KOSAN CO LTD**

(22) Date of filing : **15.08.1986**

(72) Inventor : **SUZUKI GENSHI**

KADOTA AKIHIKO

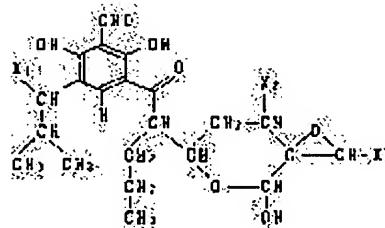
TSUZUKI MORIYUKI

(54) ANTITUMOR AGENT

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide an antitumor agent containing an SI-4228 substance as an active component, capable of suppressing the growth of cancer cell even at a low concentration and free from cytotoxicity to normal lymphocyte.

CONSTITUTION: The objective antitumor agent contains, as an active component, an SI-4228 substance of formula (X1 is H or methoxy; X2 is H or OH; X3 is methyl, ethyl, propyl or isopropyl) separated from the cultured product produced by culturing a microbial strain belonging to Streptomyces genus [e.g. Streptomyces sp. SI-4228 (FERM P-6198)] under aerobic condition at 25W34°C for 3W10 days. Examples of the compound of formula are SI-4228A (X1 is methoxy, X2 is OH and X3 is methyl), SI-4228C (X1 and X2 are H and X3 is methyl), etc. The dose of the compound is 5W1,000mg, preferably 10W300mg daily for adult patient.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

[rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑤ 日本国特許庁 (JP) ⑥ 特許出願公開
 ⑦ 公開特許公報 (A) 昭63-48213

⑧ Int.Cl.¹
 A 61 K 31/35
 C 07 D 493/10

識別記号 ADU
 行内整理番号 7330-4C
 C-8615-4C

⑨公開 昭和63年(1988)2月29日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑩発明の名称 抗腫瘍剤

⑪特 願 昭61-190575
 ⑫出 願 昭61(1986)8月15日

⑬発明者 鈴木 源士 千葉県君津郡柏ヶ浦町上原1660番地
 ⑭発明者 門田 明彦 千葉県市原市山田橋766番地1号
 ⑮発明者 郡築 司幸 東京都世田谷区船橋3丁目21番8号
 ⑯出願人 出光興産株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号
 ⑰代理人 弁理士 久保田 藤郎

明細書

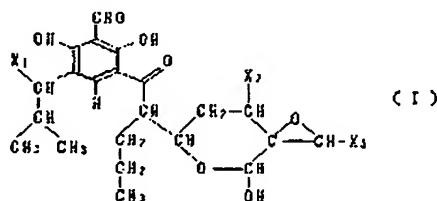
第記載の抗腫瘍剤。

1. 発明の名稱

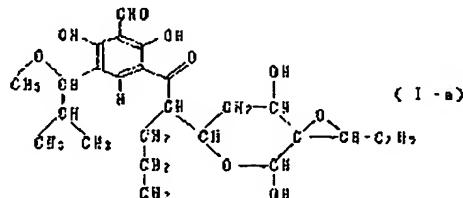
抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

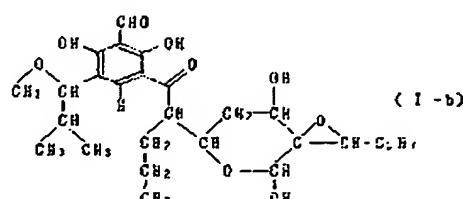
(1) 一般式 (I) で表わされるSI-4228系物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤。



(ここで、X₁は水素原子またはメトキシ基を、X₂は水素原子または水酸基を、X₃はメチル基、エチル基、プロピル基またはイソプロピル基を示す。)
 (2) SI-4228系物質が、下記の式 (I-a) で表わされるSI-4228A物質である特許請求の範囲1に記載の抗腫瘍剤。



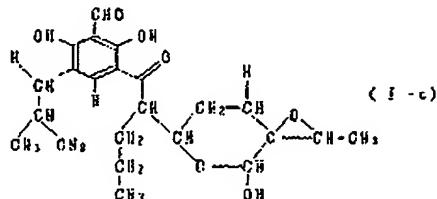
(3) SI-4228系物質が、下記の式 (I-b) で表わされるSI-4228B物質である特許請求の範囲1に記載の抗腫瘍剤。



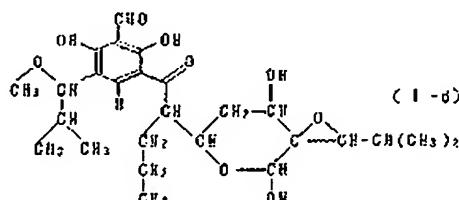
(4) SI-4228系物質が、下記の式 (I-c) で表わされるSI-4228C物質である特許請求の範囲1に記載の抗腫瘍剤。

特開昭63-48213(2)

される SI-4226C 物質である特許請求の範囲第1項記載の抗腫瘍剤。



(5) SI-4228 系物質が、下記の式 (I-d) で表わされる SI-4223D 物質である特許請求の範囲第1項記載の抗腫瘍剤。



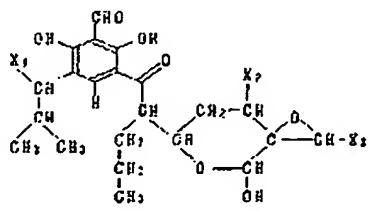
3

見出している（特開昭58-116686 号）。

【問題点を解決するための手段】

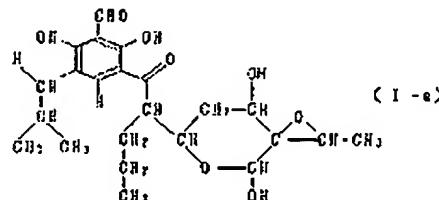
本発明者は、さらに研究を進めた結果、上記被化物はさらに各種類の構造類似の新規物質を生成することを見出すと共に、これら物質が抗腫瘍作用を有していることを知見して本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、一般式 (I) で表わされる SI-4228 系物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤に関するものである。



(ここで、X₁は水素原子またはメトキシ基を、X₂は水素原子または水酸基を、X₃はメチル基、二チ

(8) SI-4220 系物質が、下記の式 (I-e) で表わされる SI-4228E 物質である特許請求の範囲第1項記載の抗腫瘍剤。



3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明はSI-4220 系物質を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

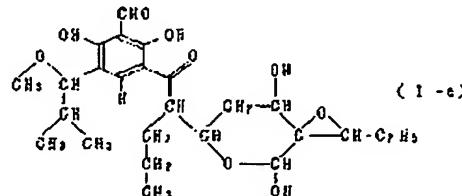
【発明の技術】

本発明者は既にストレプトミセス属に属する微生物、ストレプトミセス・エスピード SI-4228 (FERM P-6198) が新規物質を生産することならびに該物質が農業用殺菌剤として有用であることを

4

ル基、プロピル基またはイソプロピル基を示す。）

上記式 (I) において、X₁がメトキシ基、X₂が水酸基、X₃がエチル基である物質、すなわち下記の式 (I-e) で表わされる物質を SI-4228E 物質と称し、本物質の化合物名は 2-ニチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]4,5-ジオキサスビロ[2,5]オクタンである。本物質の理化学的性質は特開昭58-116686 号に記載されている。



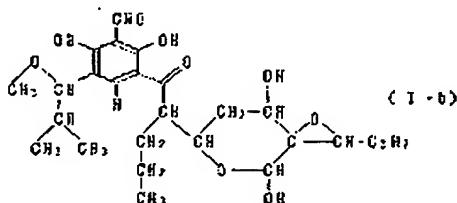
また上記式 (I) において、X₁がメトキシ基。

5

6

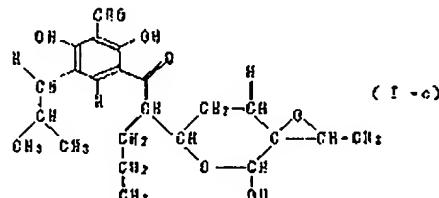
特開昭63-48213(3)

X_1 が水酸基、 X_2 がプロピル基である物質、すなわち下記の式(I-a)で表わされる物質を SI-4228B 物質と称し、本物質の化合物名は 2-プロピル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。本物質の理化学的性質は特開昭59-82087号に記載されている。



前記式(I)において、 X_1 と X_2 が水素原子であり、 X_3 がメチル基である物質、すなわち下記の式(I-c)で表わされる物質を SI-4228C 物質と称

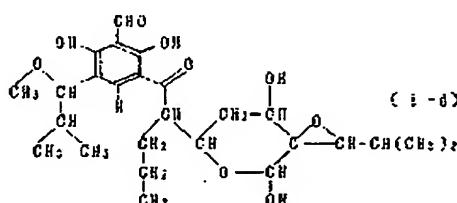
し、本物質の化合物名は 2-メチル-4-ヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。



また前記式(I)において、 X_1 がメトキシ基、 X_2 が水酸基であり、 X_3 がプロピル基である物質、すなわち下記の式(I-d)で表わされる物質を SI-4228D 物質と称し、本物質の化合物名は 2-プロピル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(1-メトキシ-2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。

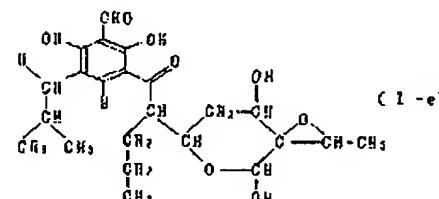
7

—ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。



前記式(I)において、 X_1 が水素原子、 X_2 が水酸基であり、 X_3 がメチル基である物質、すなわち下記の式(I-e)で表わされる物質を SI-4228E 物質と称し、本物質の化合物名は 2-メチル-4,8-ジヒドロキシ-6-[1-[2,4-ジヒドロキシ-3-ホルミル-5-(2-メチルプロピル)ベンゾイル]-ブチル]1,5-ジオキサスピロ[2,5]オクタンである。

8



これら SI-4228C 物質、SI-4228D 物質および SI-4228E 物質の理化学的性質は特開昭61-161575号明細書に記載されている。

本発明に用いる SI-4228 系物質はいずれもストレプトミセス菌に属する發生物、たとえばストレプトミセス・エスピーアー SI-4228 菌 (FERM P-6198) を培養し、培養液から該物質を採取することによって得ることができる。

培養は微生物が利用できる炭素源を含むする培地を用いて行ない、たとえば炭素源としてグルコース、シュークロース、デンプン、水アメ、デキストリン、グリセリンなどを使用できる。また、空素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アン

9

10

特開昭63-48213(4)

セニウム、肉エキス、コーン・ステイプル・リカード、ペプトン、乾燥酵母、コーン・グルテン、大豆粉その他の有機または無機の窒素化合物などを使用することができる。その他必要に応じて食塩、リン酸塩類、カルシウム、並びにマグネシウム、鉄などの無機塩類を添加したり、微生物の生育を助け、SI-4228 系物質の生産に有用な助剤を適宜添加することができる。

培養は好気的条件下に行なわれ、通常は25～34℃、好ましくは28～32℃の温度で3～10日間、好ましくは4～6日間行なうことによってSI-4228 系物質の蓄積量が最高となる。SI-4228 系物質は培養液内に蓄積される飽和体内にも蓄積される。

本発明のSI-4228 系物質は前記した理化学的性質を有するので、該性質を考慮して抽出、精製を行なう。すなわち、粗抽出物に①硫酸エチル等の有機溶剤を加えて抽出を行ない、得られた抽出液を適当な手段によって濃縮後、ベンゼンを用いて脱溶する。次いで、ゲル汎過を行ない、シリカゲル

カラムで分離、精製するの後液物の沪液をイオン交換樹脂または弱性炭酸岩に付し、次いで精製を行なった後、前述の如くシリカゲルカラムで分離精製し、さらにゲル汎過を行なってから精製化せしめる等の方法により精製されたSI-4228 系物質を得ることができる。

これらSI-4228 系物質についてボテト・グルコース寒天培地を用い倍数希釈法により求めた各種微生物に対する最小発育阻止濃度は、SI-4228 A 物質は特開昭58-118686 号に、SI-4228 B 物質は特開昭59-82087号に、SI-4228 C 物質、四D 物質および同B 物質は特開昭61-164575 号明細書にそれぞれ記載されている。

SI-4228 系物質を抗腫瘍剤として使用するときの投与量は患者の年齢、年令、体重、投与方法等により異なるが、一般に成人患者に対する1日の投与量は5～1000mg、好ましくは10～3000mgである。

SI-4228 系物質を有効成分として含むする抗腫瘍剤の投与形態は経口剤、注射剤、坐剤、注膿剤

11

などのいずれでもよい。

【発明の効果】

本発明によるとSI-4228 系物質は抗腫瘍作用を有しており、特に癌細胞に対して低濃度で用い、その増殖を抑えることができる。しかも、正常のリノバ細胞に対しては細胞障害が認められない。したがって、SI-4228 系物質は抗腫瘍剤として有用である。

【実施例】

次に、本発明を実施例により詳しく述べる。
実施例1～5 および参考例

ヒト癌細胞に対する in vitro テスト

ヒト癌に対する有効性を、ヒト癌培養細胞を用いて検討した。供試細胞はEB-3 (American Type Culture CollectionのCCL-35株細胞、大日本製薬より購入) で、 RPMI 1640 培地 (ギブコ・ラボラトリーブ) に10%牛胎児血清を添加し、継代培養したものを使用した。また、比較細胞として成人太祖血より分離したリノバ細胞 [免疫実験操作(4) - 日本免疫学会誌、(1970) 443～446頁]

12

を使用した。

癌細胞およびリノバ細胞を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640 培地に浮遊し (5×10^5 個/ml)、5%炭酸ガス、95%空気、湿度100%、37℃の環境下で培養した。

SI-4228 A～E 物質は、それぞれエタノールに溶解し、癌細胞およびリノバ細胞の培養初日には添加した。培地中の SI-4228 A～E 物質の各致死濃度は100μg/ml、エタノール濃度0.5 to 1.5%に調節した。また、SI-4228 A～E 物質を添加しない群においてはエタノールのみを添加した。

癌細胞に対する有効性はトリパンブルーを用いる dye-exclusion 法で培養瓶下にトリパンブルーに染色した細胞を計測し、細胞の生存率を求めてにより評価を行った。なお、トリパンブルーによる細胞生存率の測定は培養1日目、2日目、3日目に行った。結果を第1表に示す。

13

14

特開昭63-48213(5)

第 1 表

| | 実験群 (添加濃度, $\mu\text{g}/\text{ml}$) | テスト細胞 | 生存率 (%) | | |
|------|---|-------|---------|-----|-----|
| | | | 1日目 | 2日目 | 3日目 |
| 参考例 | 無添加 | 0 | リンパ細胞 | 98 | 88 |
| | SI-4228A | 100 | " | 93 | 87 |
| | 無添加 | 0 | EB-3細胞 | 98 | 88 |
| 実施例1 | SI-4228A物質 | 100 | EB-3細胞 | 18 | 4 |
| " 2 | " B " | 100 | " | 89 | 5 |
| " 3 | " C " | 100 | " | 28 | 4 |
| " 4 | " D " | 100 | " | 23 | 4 |
| " 5 | " E " | 100 | " | 50 | 6 |

次から明らかなように、SI-4228 系物質は正常のリンパ細胞に対しては細胞障害性を認めないが、癌細胞EB-3に対しては強い細胞障害性を示した。

実施例 6 ~ 10

特開昭58-110686 号の実施例 2 と同様の方法により SI-4228A 物質を製造した。また、特開昭

58-82067号の実施例 2 と同様の方法にて SI-4228B 物質を製造した。さらに、特開昭61-184575 号の製造例 1, 2 の方法により SI-4228C, D, E 物質を製造した。

これらの方で製造した SI-4228 系物質を用いて、KB細胞に対する増殖阻害効果を調べた。

イーグルズミニマルエッセンシャル培地 (MEM) に 10% の仔牛血清を加えた培地に KB細胞を 2×10^4 個 / 口に希釈した後 3 mℓ を組立炭酸ガスインキュベーター内 (5% 炭酸ガス, 37°C) で 24 時間培養した。次いで、SI-4228A, B, C, D, E の各物質を 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう加え、さらに 3 日間炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

その後、トリプシンを用いて細胞を培養容器からはがし、細胞数をコールターカウンターで計測し、SI-4228 系物質を全く加えていないコントロールの細胞数に対する 50% の増殖阻害率 (ED₅₀) を計算により求めた。結果を第 2 表に示す。

15

16

第 2 表

| | 物質 | ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|-------|------------|--|
| 実施例 6 | SI-4228A物質 | 1.6 |
| " 7 | SI-4228B物質 | 1.7 |
| " 8 | SI-4228C物質 | 2.4 |
| " 9 | SI-4228D物質 | 2.1 |
| " 10 | SI-4228E物質 | 2.8 |

次から明らかなように、本発明の SI-4228 系物質はいずれも低濃度で細胞の増殖を抑制した。

特許出願人 出光興産株式会社

代表人 斎理士 久保田 謙郎

17

-69-